

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 42 19 696 A 1

21 Aktenzeichen: P 42 19 696.5
22 Anmeldetag: 16. 6. 92
43 Offenlegungstag: 19. 8. 93

51 Int. Cl. 5:
C 07 K 15/04
A 61 K 37/02
C 12 N 15/62
C 12 N 15/63
C 12 N 15/74
C 12 N 1/21
// (C12N 1/21, C12R
1:42) (C12N 1/21,
C12R 1:19)

41287

DE 42 19 696 A 1

30 Innere Priorität: 32 33 31

17.02.92 DE 42 04 737.4

71 Anmelder:

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 3300 Braunschweig, DE

74 Vertreter:

Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

72 Erfinder:

Brahmbhatt, Himanshu N., 3300 Braunschweig, DE;
Su, Guo-fu, 3300 Braunschweig, DE; Wehland,
Jürgen, 3000 Braunschweig, DE; Timmis, Kenneth
N., 3000 Braunschweig, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Hybrid-DNA, Plasmide, Oligohybridpeptid und Impfstoff

57 Die Erfindung betrifft Hybrid-DNA, die dadurch gekennzeichnet ist, daß eine DNA-Struktur, die eine Untereinheit eines bakteriellen Toxins kodiert, mit einer HlyA (Haemolysin) kodierenden DNA-Struktur bzw. dessen C-terminalen Fragment fusioniert ist, ferner betrifft die Erfindung Plasmide, Wirtsstämme, Oligohybridpeptide und Impfstoffe unter Verwendung der genannten Hybrid-DNA.

DE 42 19 696 A 1

Beschreibung

Bakterielle Dysenterie, die durch Shigella-Arten hervorgerufen wird, ist eine ansteckende Erkrankung der Darmschleimhaut beim Menschen und anderen Primaten. *Shigella dysenteriae* 1 (*Shiga's bacillus*) verursacht die schwerste Form der Krankheit und kann zu ernststen Komplikationen führen, beispielsweise dem haemolytischen Uraemiesyndrom (H. U. S., wozu haemolytische Anaemie, Thrombocytopenia und akutes Nierenversagen zählen), leukämioide Reaktionen und Sepsis, insbesondere bei Kindern. Es ist gegenwärtig für eine große Pandemie verantwortlich, die den indischen Subkontinent, Teile von Afrika, Südostasien, China und Teile von Lateinamerika heimsucht.

Eins der unterscheidenden Merkmale von *S. dysenteriae* 1 ist die Bildung großer Mengen von Shigatoxin, einem der potentesten Cytotoxine, die bekannt sind. Obgleich Shigatoxin eine Vielzahl von Zelltypen abtötet, ist es besonders aktiv gegenüber vaskulären Endothelialzellen, was vermutlich für die schweren Komplikationen verantwortlich ist, die mit Infektionen durch *Shiga's bacillus* verbunden sind. Anti-Dysenterie-Impfstoffe sollten daher einen Schutz nicht nur gegen den Organismus selbst, sondern auch gegen Shigatoxin vorsehen.

Shigaartige Toxine spielen auch eine Rolle bei anderen Infektionen des Menschen und der Tiere. Einige Serotypen von *Escherichia coli*, beispielsweise O157 : H7, produzieren haemorrhagische Colitis, eine afebrile wässrige Diarrhö, die in blutige Diarrhö übergeht, und bei Versuchstieren lassen sich Symptome von haemorrhagischer Colitis dadurch reproduzieren, daß das gereinigte Toxin allein verabreicht wird. Oft sind mit haemorrhagischer Colitis schwere Komplikationen, wie H. U. S. verbunden, die gleichfalls mit *Shiga-bacillus*-Infektionen zusammenhängen. Shigaartiges Toxin produzierende *E. coli* Serotypen verursachen gleichfalls ernsthafte Erkrankungen, wie die Ödemkrankung des Schweins bei landwirtschaftlich gehaltenen Tieren, was zu beträchtlichen wirtschaftlichen Verlusten führt.

Es besteht daher ein dringendes Bedürfnis, Impfstoffe zur Anwendung sowohl auf den Human- als auch dem Tiersektor gegen Shiga und verwandte Toxine zu entwickeln.

Shiga- und shigaartige Toxine sind zweiteilige (bipartite Moleküle), die sich aus zwei verschiedenen Typen von Untereinheiten aufbauen, der A-Untereinheit ($M_r = 32\,000$) und der B-Untereinheit ($M_r = 7\,700$), die nicht-kovalent in einem stöchiometrischen Verhältnis der Untereinheiten von etwa einer A-Kette zu fünf B-Ketten assoziiert sind. Die A-Untereinheit ist gegenüber eucaryotischen Zellen toxisch, und die B-Untereinheit besitzt eine Rezeptor-Bindungsstelle, die die Aufnahme des Toxins in Zellen ermöglicht. Daher sollte eine wirksame Schleimhaut- und Serum-Anti-Toxin-Immunantwort gegen die B-Untereinheit das Eindringen des Toxins in intestinale Epithelialzellen und vaskuläre Endothelialzellen verhindern, um eine ernste Erkrankung auszuschließen.

Jedoch ist eine hochgradige Expression von Fremdpolypeptiden in Impfstoffstämmen mit mehreren Nachteilen belastet; Beispiele sind:

- (i) Das Fusionieren von heterologen Polypeptiden mit Trägermolekülen, beispielsweise dem λ MB-Protein, ist oft schwierig, da für die Größe des passierenden bzw. Passagier-Polypeptids (passenger polypeptide), das stabil eingesetzt werden kann, eine Grenze gegeben ist (Charbit et al. 1988).
- (ii) Hocheffektive Expression heterologer Polypeptide im Cytoplasma führt oft zum Abbau des Proteins und der Bildung von Einschußkörpern.
- (iii) Die Fusionierung von Fremdpolypeptiden mit Trägermolekülen, wie β -Galactosidase, im Hinblick auf eine Expression im Cytoplasma führt gleichfalls oft zu Toxizität gegenüber der Zelle, was die Impfstoffstämme unbrauchbar macht.

Es besteht daher ein Bedürfnis, ein geeignetes Expressionssystem zu entwickeln, mit dem sich große heterologe Polypeptide stabil in großer Ausbeute exprimieren lassen, ohne daß Einschußkörper gebildet werden oder Toxizität gegenüber den Impfstoffstämmen auftritt.

Unlängst ist ein genetisches System entwickelt worden, um passierende bzw. Passagierproteine (passenger proteins) aus *E. coli* in das Medium mit Hilfe einer Fusion an die 23 kD große C-terminale Signaldomäne von Haemolysin (HlyA) abzugeben; Mackman et al. 1987. Die Haemolysin-Gene sind in einem Operon (hly C, A, B, D) organisiert, und das HlyC-Protein ist in die posttranslational Aktivierung des 107 kD großen HlyA-Proteins zu seiner aktiven Form verwickelt. Der Export- bzw. Ausschleusungsmechanismus benutzt ein spezifisches Sekretionssignal in den letzten 50 C-terminalen Aminosäuren des HlyA und einen membrangebundenen Translokationskomplex, der sich aus HlyB und HlyD aufbaut (Wagner et al. 1983), sowie mindestens ein Gastprotein, das kleinere Außenmembranprotein TolC (Wandersman und Delepelaire 1990), das das HlyA-Molekül direkt zum Medium ohne periplasmatische Zwischenstufe transportiert (Gray et al. 1986 und Koronakis et al. 1989).

Dieser Stand der Technik sei wie folgt noch näher erläutert. Um oral zu verabreichende Impfstoffe gegen Infektionen zu entwickeln, die auf *S. dysenteriae* 1 zurückgehen, wurden attenuierte bzw. abgeschwächte *Salmonella*-Hybridstämme konstruiert, die das O-Antigen von *S. dysenteriae* 1 exprimieren (Mills et al. 1988 und Mills & Timmis 1988), um O-Antigen-spezifische, lokalisierte Schleimhautimmun-Antworten zu stimulieren. Eine notwendige zusätzliche Komponente der Hybridimpfstoffstämme ist der Einschluß einer in geeigneter Weise exprimierten Shigatoxin-Untereinheit B, um eine Immunantwort hervorzurufen, die die biologische Aktivität des Toxins neutralisiert, um den Schweregrad der Erkrankung herabzusetzen.

Die Expression von Fremdpolypeptiden, die an Trägermoleküle fusioniert sind, wie beispielsweise das λ MB-Protein, leidet an dem Nachteil, das es für das Passagier-Polypeptid, das stabil eingesetzt werden kann, eine Größenbeschränkung gibt (Charbit et al. 1988). Für größere Polypeptide können alternative Maßnahmen vorgesehen werden, beispielsweise eine Fusion an den N-terminalen Bereich der β -Galactosidase (Jacob et al. 1985, Brown et al. 1987). Unlängst ist ein genetisches System für die Ausschleusung von Passagier-Proteinen aus

E. coli in das Medium mit Hilfe einer Fusion an die 23 kD große C-terminale Signaldomäne von Haemolysin (HlyA) (Mackman et al. 1987) mit dem Anliegen entwickelt worden, rekombinante Proteine zu reinigen.

Das Cytotoxin, also Haemolysin, wird durch uropathogene Stämme von *Escherichia coli* (Welch et al. 1981) sekretiert und in das Medium ohne Vermittlung einer N-terminalen Signal-secA/secY-Route ausgeschleust bzw. transloziert (Felmlee et al. 1985 und Blight et al. 1990). Die Haemolysin-Gene sind in einem Operon (hly C, A, B, D) organisiert, und das HlyC-Protein ist in eine posttranslationale Aktivierung des 107 kD großen HlyA-Proteins zur cytotoxischen Form einbezogen. Der Exportmechanismus benutzt ein spezifisches Sekretionssignal in den letzten 50 C-terminalen Aminosäuren des HlyA und einen membrangebundenen Translokationskomplex, aufgebaut aus HlyB und HlyD (Wagner et al. 1983), sowie mindestens ein Gastprotein, das kleinere Außenmembran-Protein TolC (Wandersman & Delepelaire 1980), das das HlyA-Molekül direkt in das Medium ohne periplasmatische Zwischenstufe transportiert (Gray et al. 1986 und Koronakis et al. 1989).

Erfindungsgemäß wurde nun die Shigatoxin-Untereinheit B mit dem 23 kD großen C-Terminus von *E. coli* Haemolysin A (HlyA) fusioniert und festgestellt, daß das Fusionsprotein von dem attenuierten Antigen-Trägerstamm *Salmonella typhimurium* aroA-SL3261 ausgeschleust wird. Die Expression der Genfusion wurde unter der Kontrolle eines modifizierten synthetischen β -Lactamase-Promotors (konstitutive Expression) und der Kontrolle des in vivo induzierbaren Aerobactin-Promotors untersucht. Orale und intraperitoneale Immunisierung von Mäusen mit *Salmonella typhimurium* aroA-(SL3261)-Hybridstämmen führte zu einer Stimulierung von Immunantworten auf die Untereinheit B, die für Schleimhaut spezifisch ist, und von Serumantikörpern-Antworten.

Erfindungsgemäß kann damit erstmals berichtet werden, daß ein ausgewähltes Antigen (candidate antigen) von einem Antigenträger-Impfstoffstamm der Gattung *Salmonella* für antigenspezifische Immunantworten ausgeschleust wird. Dieses System weist die folgenden Vorteile auf:

- (i) Es können größere Polypeptide an die Haemolysinexportmaschine solange fusioniert werden, wie das heterologe Polypeptid keine Transferstopsequenzen ("stop transfer" sequences) kodiert.
- (ii) Da sich das Fusionsprotein nicht in den Zellen anhäuft, können sehr hohe Expressionsniveaus erreicht werden, ohne daß es zu einer Toxizität für den Impfstamm kommt.

Das erfindungsgemäße System ist daher auch zur Expression von shigaartigen Toxinen, wie SLT-II und SLT-IV, geeignet, um starke Immunantworten gegen ihre Rezeptorbindende Untereinheit zu liefern, und ferner ist es auch für andere bakterielle Toxine von Schleimhauterregern geeignet.

Erfindungsgemäß wurde also das Shigatoxin-Protein der Untereinheit B mit dem 23 kD großen C-Terminus von HlyA fusioniert, um das Untereinheit B/HlyA-Fusionsprotein in das extrazelluläre Medium zu exportieren. Derartige Hybridproteine (chimeric proteins) wurden in *Salmonella typhimurium* aroA-Antigenträger-Impfstamm SL3261 (Hoseith & Stocker 1981) zum Einsatz für orale und intraperitoneale Immunisierungen exprimiert, um zu ermitteln, ob Immunantworten stimuliert werden konnten, die für die Untereinheit B spezifisch sind.

Erfindungsgemäß wurde also die Shigatoxin-Untereinheit B mit dem 23 kD großen C-Terminus von *E. coli*-Haemolysin A (HlyA) fusioniert und von dem attenuierten Antigenträgerstamm *Salmonella typhimurium* aroA-SL3261 exportiert. Die Expression des Hybridproteins wurde unter der Kontrolle eines modifizierten synthetischen β -Lactamase-Promotors (konstitutive Expression) und unter der Kontrolle eines in vivo induzierbaren Aerobactin-Promotors untersucht. Auch wurde der Einfluß der Plasmidkopien-Anzahl unter Verwendung von Mediumkopier- und Hochleistungskopier-Plasmidvektoren untersucht. Es wurde eine Stimulierung von für die Untereinheit B spezifischen Antikörper-Antworten in Mäusen nach oraler und intraperitonealer Immunisierung mit Hybridstämmen SL3261 durchgeführt, um drei unterschiedliche Arten der Untereinheit-B-Expression zu untersuchen.

- (i) Cytoplasmatische Hochleistungsexpression der Untereinheit B.
- (ii) Das cytoplasmatisch exprimierte Untereinheit B/ β -Galactosidase-Fusionsprotein.
- (iii) Das Untereinheit B/HlyA-(23 kD C-Terminus)-Fusionsprotein, ausgeschleust in die extrazelluläre Umgebung.

Erfindungsgemäß wurde die Expression von Shigatoxin-Untereinheit B/Haemolysin-A-(C-Terminus)-Fusionsproteinen unter vier verschiedenen Bedingungen untersucht:

- (a) Die StxB/C-T: hlyA-Genfusion war unter der Kontrolle eines in vivo induzierbaren Aerobactin-Promotors, der entweder vom Plasmidvektor pBR322 (Kopienzahl etwa 30 bis 40/Zelle/Generation) oder
- (b) vom Plasmid pUC18 (Kopienzahl etwa 70/Zelle/Generation) getragen wurde und
- (c) die StxB/C-T: hlyA-Fusion war unter der Kontrolle eines konstitutiven, modifizierten, synthetischen β -Lactamase-Promotors, der eine Expression auf moderatem Niveau lieferte, wobei die Fusionen gleichfalls entweder mit Hilfe des Plasmids pBR322 oder
- (d) des Plasmids pUC18 durchgeführt wurden. Damit war eine Untersuchung der Promotorstärke und der Plasmidkopienzahl im Hinblick auf die Stabilität einer Expression des StxB/C-T: HlyA-Fusionsproteins möglich.
- (e) Ferner wurde eine Vergleichsanalyse durchgeführt, bei der die Untereinheit B auf hohem Niveau in Cytoplasma exprimiert wurde und ferner ein β -Galactosidase-Fusionsprotein in Cytoplasma exprimiert wurde.

Untersuchungen des Stands der Technik unter Einsatz der Haemolysin-Exportmaschinerie zur Sekretion

heterologer Polypeptide wurden in *E. coli* durchgeführt. Es war jedoch nicht bekannt, ob derartige Fusionsproteine auch von *Salmonella typhimurium* exportiert werden könnten. Die erfindungsgemäßen Expressionsstudien wurden gleichzeitig sowohl mit *E. coli* K-12 und dem Antigenträger-Impfstamm *S. typhimurium* aroA-SL3261 durchgeführt.

Die Vergleichsanalyse zeigte, daß die Fusionsproteine sowohl von *E. coli* K-12 als vom *S. typhimurium*-aroA-Stämmen exportiert werden konnten, was nahelegte, daß die Haemolysin-Exportmaschinerie in *S. typhimurium* funktionierte. Rekombinante Plasmide auf Basis von pUC18 erwiesen sich jedoch als für die Zellen toxisch, wobei ein gewisser Abbau des Fusionsproteins festgestellt werden konnte. Die Bakterienzellen, die die Plasmide beherbergten, konnten nicht bis zu einer Zelldichte von mehr als 10^7 Lebendzellen/ml gezüchtet werden. Andererseits waren die Plasmide auf Basis von pBR322 stabil; es gab keinen Hinweis auf einen Abbau des Fusionsproteins, wobei eine Lebendzelldichte von 10^9 Zellen/ml leicht zu erzielen war. Bei früheren Untersuchungen, bei denen verschiedene Regionen der Shigatoxin-Untereinheit B in die der Bakterienzelloberfläche ausgesetzte Schleife des LamB-Proteins fusioniert wurden, wurde festgestellt, daß nur kurze Untereinheit B-Polypeptide stabil unter Verwendung von LamB als Trägermolekül exprimiert werden konnten. Die vollständige Untereinheit B (69 Aminosäuren), die in das LamB-Expressionssystem fusioniert worden war, erwies sich gegenüber den Wirtsbakterien als toxisch und bildete große intrazelluläre Aggregate. Die Haemolysin-Exportmaschinerie scheint daher dann geeignet zu sein, wenn größere Polypeptide als Fusionsproteine exprimiert werden müssen, sofern das eingefügte Polypeptid keine Übertragungs-Stoppsequenzen ("stop-transfer" sequences) aufweist.

Die *S. typhimurium* aroA-Hybridstämme, die die Untereinheit B als

(i) Cytoplasma-Protein exprimieren oder

(ii) fusioniert an β -Galactosidase und cytoplasmatisch exprimieren oder

(iii) fusioniert mit HlyA (C-Terminus) in die extrazelluläre Umgebung ausschleusen, wurden zur oralen und intraperitonealen Immunisierung von Mäusen verwendet, um zu untersuchen, welches Expressionssystem sich bei der Stimulierung von für die Untereinheit B spezifischen Antikörperantworten als am wirksamsten erwies.

Die Ergebnisse zeigen, daß signifikante Antikörperantworten auf die Untereinheit B mit allen drei Systemen erreicht werden konnten. Jedoch scheint eine hochgradige Expression des gewünschten Antigens (candidate antigen) für das Wirtsbakterium nachteilig zu sein, so daß eine moderate Expressionsrate zweckmäßiger erscheint. Eine konstitutive Expression, beispielsweise mit dem synthetischen β -Lactamase-Promotor, oder ein in vivo induzierbares System, beispielsweise mit dem Aerobactin-Promotor, lieferte bessere Ergebnisse bezogen auf die Stabilität des Wirtsbakteriums.

Die Serumantworten waren im allgemeinen stärker als die Schleimhautantikörper-Antworten. Ein möglicher Grund für diese Beobachtung könnte darin zu sehen sein, daß die Gewinnung bzw. Isolierung von Antikörpern aus dem Darm erschwert ist. Untereinheit B/ β -Galactosidase-Fusionsproteine zeigten beträchtlich höhere β -Galactosidase-Antworten, was möglicherweise eine höhere Epitopdichte bei dem viel größeren β -Galactosidase-Polypeptid (107 kD) im Vergleich zur Untereinheit B (7,7 kD) widerspiegelt.

Nachstehend wird die Erfindung durch Figuren und experimentelle Daten näher erläutert.

Figurenbeschreibung

Fig. 1: Plasmidkonstruktionen für die Expression von StxB/C-T : HlyA-Fusionsproteinen. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die relevanten Teile der Einfügungen der Plasmide dargestellt.

Fig. 2: Western-Blott-Analyse der Expression von Shigatoxin-Untereinheit B/Haemolysin-A-(C-Terminus)-Fusionsproteinen. Die Bereiche der Untereinheit B der Fusionsproteine wurden durch für die Untereinheit B spezifische monoklonale Antikörper StxBmb1 ermittelt.

(A) Bahn 1, *E. coli* JM101/pLG612 + pLG575 (Gesamtzellextrakt); Bahn 2, Kulturüberstand der Zellen von Bahn 1; Bahn 3, JM101/pSU204 + pLG575 (Aerobactin-Promotor/stxB/C-T : hlyA/pBR322; Gesamtzellextrakt); Bahn 4, Kulturüberstand der Zellen von Bahn 3; Bahn 5, JM101/pSU206 + pLG575 (MS β -Lactamase-Promotor/stxB/C-T : hlyA/pBR322; Gesamtzellextrakt); Bahn 6, Kulturüberstand der Zellen von Bahn 5.

(B) Man vergleiche Fig. 2A mit der Ausnahme, daß der Wirtstamm *Salmonella typhimurium* aroA-SL3261 ist.

(C) Bahn 1, SL3261/pLG612 + pLG575 (Gesamtzellextrakt); Bahn 2, Kulturüberstand der Zellen von Bahn 1; Bahn 3, SL3261/pSU203 + pLG575 (Aerobactin-Promotor/stxB/C-T : hlyA/pUC18; Gesamtzellextrakt); Bahn 4, Kulturüberstand der Zellen von Bahn 3; Bahn 5, SL3261/pSU205 + pLG575 (MS β -Lactamase-Promotor/stxB/C-T : hlyA/pUC18; Gesamtzellextrakt); Bahn 6, Kulturüberstand der Zellen von Bahn 5.

Fig. 3: Schleimhaut- und Serumantikörperantworten in Mäusen nach oraler und intraperitonealer Immunisierung mit verschiedenen *S. typhimurium* aroA-(SL3261)-Hybridstämmen.

Fig. 3.1: Antworten auf die Untereinheit B nach Immunisierung mit SL3261/pSU108 (cytoplasmatische Hochleistungsexpression der Untereinheit B) und SL3261/pJL503 (negative Kontrolle).

Fig. 3.2: Antikörperantworten auf Untereinheit B und D-Galactosidase nach Immunisierung mit SL3261/pSU207 (Untereinheit B/ β -Galactosidase-Fusionsprotein, cytoplasmatisch exprimiert; Expression der Kontrolle des Aerobactin-Promotors) und SL3261/pcon1 (Plasmidvektor, der lacZ unter der Kontrolle des Aerobactin-Promotors exprimiert; negative Kontrolle auf Antworten auf die Untereinheit B).

Fig. 3.3: Antikörperantworten auf Untereinheit B nach Immunisierung mit SL3261/pLG575/pSU204 (Expression von stxB/C-T : hlyA unter der Kontrolle des Aerobactin-Promotors), SL3261/pLG575/pSU206 (Expression von stxB/C-T : hlyA unter der Kontrolle des MS- β -Lactamase-Promotors) und SL3261/pLG575/pLG612 (Expression von C-T : hlyA unter der Kontrolle des lac-Promotors; negative Kontrolle auf Antworten auf die Untereinheit B).

Materialien und Methoden

Bakterienstämme, Plasmide und Medien

E. coli-Stamm JM101 (F⁻, traD36, lacI^q, (lacZ)M15, proAB, supE, thi, lac-proAB; vergleiche Yanisch-Perron et al. 1985) wurde als Empfänger für alle rekombinanten Plasmide verwendet. Die *Salmonella*-typhimurium-aroA-Mutante SL3261 (Hoseith & Stocker 1981) und der restriktionsnegative *S.*-typhimurium-Stamm SL5283 wurden von B. A. D. Stocker (Stanford Univ. Schl. of Medicine, USA) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pLG612 (trägt den 23 kD großen C-Terminus von hlyA und einen Teil des N-Terminus von hlyB unter der Kontrolle des lac-Promotors, der mit IPTG induziert werden kann) und pLG575 (Chloramphenicol-resistentes Plasmid), das die hlyB- und hlyD-Gene trägt, geklont in das tet-Resistenzgen des Plasmids pACYC184 (Mackman et al. 1985) wurden von Dr. Holland (Univ. of Leicester, U. K.) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pSU201 (Guo-fu Su et al. 1992) trägt das stxB-Gen unter der Kontrolle des Aerobactin-Promotors und die Plasmide pBR32 (Bolivar et al. 1977) und pUC18 (Yanisch-Perron et al. 1985) wurden als Klonierungsvektoren für allgemeine Zwecke verwendet. Die folgenden Plasmide wurden von Guo-fu Su und Mitarbeitern beschrieben (1992);

- (i) Plasmid pSU108 (trägt das stxB-Gen unter der Kontrolle von λ -P_L- und λ -P_R-Promotoren, die wärmeinduzierbar sind);
- (ii) Plasmid pJLA503 (Hochleistungsexpressions-Plasmid; Schauder et al. 1987);
- (iii) Plasmid pSU207 (trägt die stxB/lacZ-Genfusion unter der Kontrolle eines Aerobactin-Promotors);
- (iv) Plasmid pcon 1 (trägt das lacZ-Gen unter der Kontrolle eines Aerobactin-Promotors; Lorenzo et al. 1987) und Luria-Brühe und Luria-Agar (Miller 1972) wurden als vollständige Medien für routinemäßiges Wachstum aller Stämme verwendet; falls erforderlich, wurden Bakterienwachstumsmedien mit Antibiotika Ampicillin (100 μ g/ml) oder Chloramphenicol (30 μ g/ml) supplementiert. Restriktionsendonuclease, T4-DNA-Ligase, DNA-Polymerase (Klenow Enzym) und alle anderen Enzyme wurden entweder von Böhlinger GmbH (Mannheim, Deutschland) oder von New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.) bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

DNA-Manipulationen: DNA-Präparation und genetische Manipulationen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Maniatis et al. 1982); Plasmid DNA-Transformation von Bakterienzellen wurden gemäß Hanahan (1983) vorgenommen.

SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese: Diskontinuierliche Natrium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) wurde gemäß Schagger & Jagow (1987) vorgenommen. Zuvor markierte SDS-Page-Molekulargewichtsmarker waren entweder von Bio-Rad (97,4, 66,2, 45,0, 31,0, 21,5 und 14,4 kD) oder von Sigma (84,0, 58,0, 48,5, 36,5, 26,6 kD); man vergleiche die Figuren.

Western-Blott-Analyse von Gesamtzellextrakten und Kulturüberstandfraktionen: Bakterienzellen von Übernachtskulturen (1 ml) wurden durch Zentrifugieren gesammelt. Zu den Überstandsfractionen (etwa 900 μ l) gab man 100 μ l 100proz. TCA (Tri-Chlor-Essigsäure), um extrazelluläre Proteine auszufällen. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Probe bei 4°C 30 min. lang inkubiert und 15 min. lang zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Protein Pellet (Kulturüberstandsfraction) wurde in 20 μ l Puffer resuspendiert (16 μ l 1M Tris-base, 2 μ l 10 \times Crack Puffer [1 \times Crack Puffer: 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 1proz. SDS, 1proz. 2-Mercaptoethanol, 10-proz. Glycerin 0,01 mmg Bromphenol blau] 2 μ l Glycerin). Das Bakterien Pellet (Gesamtzellfraction) wurde in 50 μ l Puffer resuspendiert. Der Überstand und die Gesamtzellfraktionen wurden auf 100°C 10 min. lang erhitzt, bevor man 20 μ l-Proben auf SDS-page gab. Nach Elektrophorese wurden die Gele auf Nitrozellulose blottiert; die Anwesenheit von Shiga toxin-Untereinheit B/HlyA-Fusionsproteinen wurde durch für die Untereinheit B spezifische monoklonale Antikörper StxBMbl nachgewiesen (Guo-Fu Su et al. 1992).

Immunisierung und Sammeln von Seren und Darmwäschen: 8 bis 10 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse (vier Mäuse pro Immunisierung) wurden oral und intraperitoneal praktisch gemäß Guo-Fu Su und Mitarbeitern (1992) immunisiert. Inocula zur Immunisierung wurden folgendermaßen vorgesehen.

Es wurden über Nacht Kulturen des *S. typhimurium*-aroA-Stammes SL3261, die entweder das Plasmid pSU108 oder das Plasmid pJLA503 (Negativkontrolle) trugen, frisch in Luria-Brühe mit einem Gehalt an Ampicillin kultiviert, bis ein CD₆₀₀-Wert von 0,7 erreicht wurde. Die Zellen wurden für 45 min. auf 42°C gebracht, um die λ -P_L- und λ -P_R-Promotoren zu induzieren. Die Kulturen wurden zweimal in steriler normaler Kochsalzlösung gewaschen und in einem geeigneten Volumen Kochsalzlösung bis zu einer Endkonzentration von 10¹¹ CFU/ml resuspendiert, 0,1 ml der Zellsuspension wurden für die orale Immunisierung verwendet. Ferner wurden die Zellen auf 10⁶ CFU/ml verdünnt, wobei 0,1 ml Zellen für die intraperitoneale Immunisierung verwendet wurden.

SL3261-Stämme, die entweder das Plasmid pcon1 (Negativkontrolle) oder das Plasmid pSU207 trugen, wurden gleichfalls wie vorstehend wachengelassen, bis der OD₆₀₀-Wert 0,3 erreichte. Man gab 2,2'-Bipyridyl hinzu (Endkonzentration 100 μ M, zum Induzieren des Aerobactin-Promotors); man ließ die Zellen weiter 3 h lang wachsen. Die Kulturen wurden gewaschen, resuspendiert und wie vorstehend zum Immunisieren verwendet. Man ließ SL3261/pLG575-Stämme, die entweder das Plasmid pLG612 (Negativkontrolle), pSU204 oder

pSU206 trugen, wie vorstehend in Luria-Brühe (ergänzt mit Ampicillin und Chloramphenicol) wachsen, bis der OD₆₀₀-Wert 1,0 (für Plasmid pSU206) bzw. 0,3 (für Plasmid pLG612 und pSU204) erreichte. Zellen mit Plasmid pLG612 wurden mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert, und Zellen mit Plasmid pSU204 wurden mit 2,2'-Bipyridyl (Endkonzentration 100 µM) induziert. SL3261/pLG575/pLG612-Kulturen ließ man ferner 45 min. lang und SL3261/pLG575/pSU204-Kulturen ferner 3 h lang wachsen. Die Zellen wurden gewaschen, resuspendiert und zum Immunisieren wie vorstehend verwendet.

ELISA: Proben für ELISA wurden reihenweise in einer mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (pH 7,2) verdünnt. Bestimmungen der Anti-Untereinheit B und der Anti-Galactosidase wurden dadurch durchgeführt, daß man zuvor Mikrotiterplatten mit 1 µg gereinigter Untereinheit B (Guo-Fu Su et al. 1992) bzw. 1 µg gereinigter B-Galactosidase (von Sigma Chemical Co.) überzog. Für Serumbestimmungen von IgG + IgM wurde IgG + IgM (peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG + IgM; von Dianova) verwendet; Schleimhaut-IgA wurde dadurch bestimmt, daß man IgA (peroxidase conjugated goat anti-mouse IgA; von Southern Biotechnology Inc.) verwendete. Die Ergebnisse wurden mit einem Bio-Rad-Microplate-Reader (Modell 3550) gelesen.

Plasmidkonstruktion zur Expression von HlyA-(C-Terminus)/Untereinheit B-Fusionsproteinen: Das EcoRI/BglIII-Fragment des Phagemids pSU201, das stxB unter der Kontrolle des Aerobactin-Promotors trug, wurde in die EcoRI/Small-Stellen des Plasmids pUC18 subkloniert, wobei man Plasmid pSU202 erhielt; Fig. 1. Die C-terminale 23 kD große Region von hlyA (als C-T : hlyA bezeichnet) und etwa 50 Basenpaare des N-terminalen Bereichs von hlyB auf einem SmaI/Hpa-Fragment wurden in die HincII-Stelle des Plasmids pSU202 eingesetzt. Das resultierende Plasmid pSU203 (Fig. 1) trägt das stxB-Gen, das im Leserahmen mit C-T : hlyA fusioniert ist. Das EcoRI/HindIII-Fragment des Plasmids pSU203, das die Aerobactin-Promotor/stxB/C-T : hlyA-Kassette trägt, wurde in die EcoRI-HindIII-Stelle des Plasmids pBR322 subkloniert, wobei man Plasmid pSU204 erhielt; Fig. 1. Das EcoRI/BamHI-Fragment von Plasmid pSU203, das den Aerobactin-Promotor trägt, wurde durch den modifizierten synthetischen β-Lactamase-Promotor ersetzt (als MS β-Lactamase-Promotor bezeichnet). Diese Konstruktion führte zum Plasmid pSU205 (Fig. 1), das eine EcoRI-HindIII-Kassette trägt, die die MS-β-Lactamase-Promotor/stxB/C-T : hlyA-Region umfaßt, die in die EcoRI/HindIII-Stellen des Plasmids pBR322 eingesetzt werden konnte, wobei man Plasmid pSU206 erhielt; Fig. 1.

Die Plasmide pSU203 und pSU204 (die die Aerobactin-Promotor/stxB/C-T : hlyA-Kassette im Vektor pUC18 bzw. pBR322 tragen) und die Plasmide pSU205 und pSU206 (die die MS-β-Lactamase-Promotor/stxB/C-T : hlyA-Kassette im Vektor pUC18 bzw. pBR322 tragen) wurden in E. coli K 12- und S. typhimurium-aroA-Stämme SL3261 transformiert, die Plasmid pLG575 trugen. Vor der Transformation bei S. typhimurium aroA-SL3261 wurden die Plasmide zuerst durch den restriktionsnegativen Stamm S. typhimurium SL5283 passiert.

Western-Blott-Analyse von StxB/C-T : HlyA-Fusionsproteinen in E. coli K 12 und Salmonella-typhimurium-aroA-Stamm SL3261: Das Pellet und die Überstandsfractionen der Bakterienzellen, die die rekombinanten Plasmide bzw. die Vergleichsplasmide beherbergten, wurden an SDS-PAGE eine Elektrophorese und eine Western-Blott-Analyse auf Nitrocellulose unterworfen. Man ermittelte die Fusionsproteine, indem man den für die Untereinheit B spezifischen monoklonalen Antikörper SStxBMbl einsetzte (Fig. 2). Man stellte fest, daß das StxB/C-T : HlyA-Fusionsprotein in die extracelluläre Umgebung bei allen untersuchten Stämmen exportiert wurde; Fig. 2A, 2B und 2C; Bahnen 4 und 6. Das StxB/C-T : HlyA-Fusionsprotein, das vom Aerobactin-Promotor exprimiert wird, ist 7 kD größer als das gleiche Fusionsprotein, das vom MS-β-Lactamase-Promotor exprimiert wird, da das EcoRI/BamHI-Aerobactin-Promotor-Fragment im Plasmid pSU201 (Fig. 1) ferner einen Teil des icuA-Gens trägt (das erste Gen des Aerobactin Operons), das ein 7 kD großes Polypeptid kodiert (Lorenzo et al. 1987). Die Menge des exprimierten Fusionsproteins war viel größer in Plasmiden auf Basis von pUC18 als in Vektoren auf Basis von pBR322; man vergleiche Fig. 2B und 2C; Bahnen 4 und 6. Jedoch führte die höhere Expressionsrate auch zu einem gewissen Abbau des Fusionsproteins (Fig. 2C; Bahnen 4 und 6), wobei sich Toxizität gegenüber den Wirtszellen ergab. Da es nicht möglich war, diese Bakterien zu einer Lebendzell-dichte von mehr als 10⁷/ml heranwachsen zu lassen. Die Konstrukte auf Basis von pBR322 waren stabil, wobei man die Zellen bis zu 10⁹ Lebendzellen/ml heranwachsen lassen konnte.

Analyse von für die Untereinheit B spezifischen Immunantworten in Mäusen nach oraler und interperitonealer Immunisierung mit dem Salmonella-typhimurium-aroA-Hybridstamm SL3261: Man analysierte Salmonella typhimurium-aroA-Stämme (SL3261), die die Untereinheit B in drei verschiedenen Formen exprimieren, zum Stimulieren von für die Unterheit B spezifischen Immunantworten in Mäusen nach oraler bzw. interperitonealer Immunisierung. Die getesteten Expressionssysteme umfaßten folgende Expressionen:

- (i) Cytoplasmatische Hochleistungsexpression der Untereinheit B (Plasmid pSU108; Guo-Fu Su et al. 1992);
- (ii) cytoplasmatische Expression eines Untereinheit B/β-Galactosidase-Fusionsproteins (Plasmid pSU207; Guo-Fu Su et al. 1992);
- (iii) Untereinheit B/C-T : HlyA-Fusionsprotein, exprimiert entweder unter der Kontrolle des Aerobactin- oder des MS-β-Lactamase-Promotors (Plasmide pSU204 und pSU206).

Diese Fusionsproteine wurden in den extrazellulären Darm exportiert. Man analysierte Darmflüssigkeit auch Anti-Untereinheit B-Schleimhaut-IgA- und Serumantikörper-Antworten (IgG + IgM), während man das Serum der interperitonealen Immunisierung von Mäusen auf Antikörper-Antworten (IgG + IgM) analysierte. Die Proben, die man nach Immunisierung mit S. typhimurium-aroA erhielt, daß das Plasmid pSU207 trug, wurde auf β-Galactosidase-Antworten untersucht. Die Ergebnisse (Fig. 3.1, 3.2 und 3.3) zeigten, daß in allen Fällen Signifikante für die Untereinheit B spezifischer Antikörper-Antworten sowohl im Serum als auch in der Darmflüssigkeit ermittelt werden konnten. Jedoch waren Salmonellen, die das Plasmid pSU108 trugen, instabil, und zwar vermutlich infolge der hochgradigen Expression der rekombinanten Untereinheit B. Die Serumantikörper-Antworten waren im allgemeinen höher als die Schleimhautantikörper-Antworten. Für Plasmid pSU207 (Fig. 3.2)

waren die Anti- β -Galactosidase Antikörper-Antworten beträchtlich höher als die für die Untereinheit B spezifischen Antikörper-Antworten.

Lebendmaterial	Zugang	
DNA für HlyA	siehe pSU 204 = DSM 7045 oder pSU 205 = 7046	5
SLT-II	Strockbin et al., Infect. Immun., 53 (1986) 135–140 und 50 (1985) 695–700	
SLT-IIv	loc. cit.	10
β -Lactamase-Promotor	siehe pSU 205 = DSM 7046	
Aerobactin-Promotor	siehe pSU 204 = DSM 7045	
pBR 322	Boehringer Mannheim	
pUC 18	Boehringer Mannheim	15
S. t. aroA SL 3261	Hosieth & Stocker 1981	

References:

- Blight MA, Holland IB (1990) Structure and function of haemolysin b, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Molec. Microbiol.* 4: 873–880. 20
- Bolivar F, Rodriguez RL, Betlach MC, Boyer HW (1977) Construction and characterisation of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of plasmid pMB9. *Gene* 2: 75–93.
- Brown A, Hormaeche CE, De Hormaeche RD, Winther M, Dougan G, Maskell DJ, Stocker BAD (1987) An attenuated aroA *Salmonella typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned β -galactosidase in mice. *J. Infect. Dis.* 155: 86–92. 25
- Charbit A, Molla A, Saurin W, Hofnung M. (1988) Versatility of a vector to express foreign polypeptides at the surface of Gram-negative bacteria. *Gene* 70: 181–189.
- Felmlee T, Pellet S, Lee E-Y, Welch R (1985) *Escherichia coli* haemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J. Bacteriol.* 163: 88–93. 30
- Gray L, Mackman N, Nicaud J-M, Holland IB (1986). . . *Mol. Gen. Genet.* 205: 127–133.
- Guo-Fu Su, Brahmabhatt HN, Wehland J, Rohde M, Timmis KN (1992) Construction of stable Lamb/Shiga toxin B-subunit hybrids, analysis of expression in *Salmonella typhimurium* aroA-strains and stimulation of B-subunit specific mucosal and serum antibody responses: Potential anti-Shiga toxin component of dysentery vaccine. . .
- Hanahan D (1983) Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 577–580. 35
- Heisset SK, Stocker B. A. D. (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238–239.
- Koronakis V, Kornakis E, Hughes C (1989) Isolation and analysis of the C-terminal signal directing the export of *Escherichia coli* haemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J.* 8: 595–605.
- Lorenzo VD, Wee S, Herrero M, Neilands JB (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J. Bacteriol.* 169: 2624–2630. 40
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY.
- Mackman N, Nicaud J-M, Gray L, Holland IB (1985) Genetical and functional organization of the *Escherichia coli* haemolysin determinant 2001. *Mol. Gen. Genet.* 201: 282–288.
- Mackman N, Baker K, Gray L, Haigh R, Nicaud J-M, Holland IB (1987) Release of a chimeric protein into the medium from *Escherichia coli* using the C-terminal secretion signal of haemolysin. *EMBO J.* 6: 2835–2841. 45
- Mills SD, Sekizaki T, Gonzalez-Carrero MI, Timmis KN (1988) Analysis and genetic manipulation of *Shigella* virulence determinants for vaccine development. *Vaccine* 6: 116–122.
- Mills SD, Timmis KN (1988) Genetics of O-antigen polysaccharide biosynthesis in *Shigella* and vaccine development. In: Cabello FC, Pruzzo C (Eds) *Bacteria, Complement and the Phagocytic Cell.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 21–39. 50
- Sch gger H, Jagow GV (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368–379.
- Schauder B, Bl cker H, Frank R, McCarthy JEG (1987) Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* atpE translation initiation region. *Gene* 52: 279–283. 55
- Smith HW (1963) The haemolysins of *Escherichia coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* 85: 197–211.
- Wagner W, Vogel M, Goebel W (1983) Transport of haemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. *J. Bacteriol.* 154: 200–210.
- Wandersman C, Delep laire P (1990) TolC, and *Escherichia coli* outer membrane protein required for haemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4776–4780. 60
- Welch RA, Patchen-Dellinger E, Minschew B, Falkow S (1981) Haemolysin contributes to virulence of extraintestinal *E. coli* infections. *Nature* 294: 663–667.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103–109. 65

Patentansprüche

1. Hybrid-DNA, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Struktur, die eine Untereinheit B eines bakteriell-

len Toxins kodiert, mit einer HlyA (Hämolysin) kodierenden DNA-Struktur bzw. dessen C-terminalen Fragment fusioniert ist.

2. Hybrid-DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem bakteriellen Toxin um Shigatoxin oder shigaartige Toxine handelt, beispielsweise SLT-II oder SLT-IIv.

3. Hybrid-DNA nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß den beiden kodierenden DNA-Strukturen ein konstitutiver Promotor oder ein unter in-vivo-Bedingungen induzierbarer Promotor vorgeschaltet ist.

4. Hybrid-DNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß den beiden kodierenden DNA-Strukturen ein Promotor zur Expression in einem Salmonella-Stamm, insbesondere S. typhimurium, beispielsweise S. t. aroA-SL3261, vorgeschaltet ist.

5. Hybrid-DNA nach Anspruch 4, gekennzeichnet durch einen β -Lactamase-Promotor vom Wildtyp oder als Modifikation des Wildtyps, wobei der Promotor synthetisch hergestellt sein kann oder nicht.

6. Hybrid-DNA nach Anspruch 4, gekennzeichnet durch einen Aerobactin-Promotor.

7. Plasmid, gekennzeichnet durch eine Hybrid-DNA gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche.

8. Wirtsstamm, gekennzeichnet durch ein Plasmid gemäß Anspruch 7, insbesondere Salmonella-Stamm, insbesondere S. typhimurium, beispielsweise S. t. aroA-SL3261.

9. Oligohybridpeptid, gekennzeichnet durch die Untereinheit eines bakteriellen Toxins, die mit HlyA bzw. mit dessen C-terminalen Fragment fusioniert ist.

10. Impfstoff, bestehend aus oder umfassend das Oligohybridpeptid gemäß Anspruch 9.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen











